

Potensi Metabolit Sekunder dari *Trichoderma* sp. LBKURCC22 Tanah Gambut Hutan Sekunder Sebagai Antibiotik

Nungki Narasswati, Rani Oktavia, Nuryani Nenci, Yum Eryanti, Titania Tjandrawati Nugroho, Yuana Nurulita*

Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau, Pekanbaru

*Penulis korespondensi: ynurulita@lecturer.unri.ac.id

DOI: <https://doi.org/10.24198/cna.v5.n2.14692>

Abstrak: *Trichoderma* sp. LBKURCC22 adalah isolat lokal yang diisolasi dari lahan hutan rawa gambut sekunder. Isolat ini berpotensi menghasilkan metabolit sekunder. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menggali potensi metabolit sekunder dari isolat *Trichoderma* sp. LBKURCC22 dalam fermentasi batch. Metabolit sekunder diekstraksi dengan etil asetat. Ekstrak diuapkan, kemudian diperoleh ekstrak kasar. Analisis dilakukan dengan uji fitokimia, KLT, dan KCKT. Selanjutnya, aktivitas antibiotik dilakukan terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dengan metode dilusi. Uji fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak mengandung alkaloid. Namun, aktivitas antibakteri, senyawa metabolit sekunder dari ekstrak tidak aktif terhadap bakteri-bakteri yang diuji. Hasil penelitian menunjukkan bahwa KLT dengan eluen etil asetat:*n*-heksana (6:4) setelah disemprot dengan 0,5% *p*-anisaldehid menunjukkan tidak adanya peptaibol pada noda P1 (Rf :0,78), P2 (Rf 0,65), dan P3 (Rf 0). Analisis KCKT menghasilkan ekstrak mengandung satu puncak pada waktu retensi (tR) 4,115 menit pada 214 nm dan 4,106 menit pada 227 nm. Penelitian ini menunjukkan bahwa isolat *Trichoderma* sp. LBKURCC22 tidak memproduksi metabolit sekunder yang berpotensi sebagai antibiotik. Perlu dilakukan analisis lebih lanjut untuk mengeksplorasi potensi isolat ini.

Kata kunci: antibiotik, fitokimia, resistensi, *Trichoderma*

Abstract: *Trichoderma* sp. LBKURCC22 is local fungi isolated from secondary peat swamp forest soil. It potentially produces secondary metabolites. The purpose of this study was to explore the potency of secondary metabolites of this isolate in batch fermentation with and without *Escherichia coli* stimulation. Metabolites are extracted by ethyl acetate. The crude extract was evaporated, then was obtained concentrated extract. The analysis were done by phytochemical test, TLC and HPLC. Furthermore, the antibiotic activity was performed on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* using diffusion methods. Phytochemical tests showed that crude extracts contained alkaloids. Unfortunately, assessment of antibacterial assay showed the secondary metabolite compounds of the extract was inactive against these pathogen bacteria. TLC analysis with eluent ethyl acetate: *n*-hexane (6:4) after spraying with 0.5% *p*-anisaldehyde showed no presence of peptaibol in these stains; P1 (Rf 0.78), P2 (Rf 0.65), and P3 (Rf 0). HPLC results in concentrated extract contained one peak at retention time (tR) 4.110 min at 214 nm and 4.106 min at 227 nm. This research showed that isolate *Trichoderma* sp. LBKURCC22 did not produce antibiotics as secondary metabolites. Further analysis is needed to explore other potency of this isolate.

Keywords: antibacterial, phytochemical, resistant, *Trichoderma*

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara yang memiliki lahan gambut terluas ke-4 di dunia dan pertama di Asia. Luas lahan gambut di Provinsi Riau sendiri mencapai 4,1 juta ha dan telah dialihfungsikan menjadi perkebunan yang mencapai 817.593 ha (Suwondo *et al.* 2012). Salah satu area hutan gambut di Riau adalah Cagar Biosfer Giam Siak Kecil – Bukit Batu (GSKBB). Area cagar biosfer ini memiliki area hutan alami (primer dan sekunder) yang dapat dimanfaatkan masyarakat lokal dan beberapa perusahaan perkebunan untuk aktivitas pertanian dan perikanan.

Masalah kesehatan yang kerap muncul dan berkembang pada saat sekarang ini salah satunya

adalah penyakit infeksi. Penyakit infeksi merupakan salah satu masalah dalam dunia kesehatan, dan hampir setiap negara mengalami masalah dengan penyakit infeksi. Penyakit infeksi merupakan penyakit yang disebabkan oleh mikroba patogen dan bersifat sangat dinamis (Cristin & Bodhi 2016). Antibiotik bisa berasal dari berbagai sumber misalnya dari zat bioaktif dari mikroorganisme, hewan dan tumbuhan. Penggunaan antibiotik dari mikroorganisme cenderung lebih baik untuk lingkungan karena tidak merusak keanekaragaman hayati dan mikroorganisme merupakan makhluk hidup yang cepat dalam perkembangbiakannya (Abubakar *et al.* 2011). Teknik serta langkah-langkah untuk mendapatkan antibiotik baru sangat dibutuhkan

dalam pengembangannya agar potensi ini tidak terlewatkan begitu saja.

Masih terbatasnya penelitian eksplorasi mikroorganisme dari tanah gambut membuka peluang penelitian dari sampel tanah gambut. Hal ini dikarenakan karakteristik mikroorganisme di tanah ini berbeda khususnya kondisi anaerobik akibat genangan air, asam (pH sangat rendah berkisar 2 - 4), dan memiliki kandungan senyawa organik yang tinggi akibat rendahnya aktivitas dekomposisi mikroorganisme. Tingginya kadar senyawa organik terutama asam humat di tanah gambut dapat membuka peluang besar untuk menemukan mikroorganisme yang potensial sebagai antibiotik (Gu & Karthikeyan 2008). Peneliti di Laboratorium Enzim, Fermentasi, dan Biologi Molekuler Jurusan Kimia FMIPA Universitas Riau telah mengisolasi beberapa jenis mikroba dari tanah gambut Hutan Sekunder GSKBB, salah satunya adalah jamur *Trichoderma* sp. LBKURCC22 yang telah diuji memiliki aktivitas kitinase (Suhyana 2012).

Penelitian berbagai galur *Trichoderma* untuk memproduksi berbagai senyawa metabolit sekunder yang bersifat antibiotik telah banyak dilakukan. Berbagai antibiotik yang telah diisolasi dari *Trichoderma* antara lain merupakan senyawa steroid seperti viridiol (Wipf & Kerekes 2003), azaphilone (Vinale *et al.* 2006), peptaibol (Duclozier 2007), dan peptaibiotik (Degenkolb *et al.* 2008). Menurut Phupiewkham *et al.* (2015), *Trichoderma harzianum* memiliki aktivitas melawan bakteri patogen manusia dan enterobakteri. Maraknya perkembangan bakteri patogen yang resisten terhadap antibiotik yang ada di pasaran, telah memicu penelitian untuk mendapatkan antibiotik-antibiotik baru. Untuk itu perlu dilakukan penelitian melihat potensi metabolit sekunder dari sekresi *Trichoderma* sp. LBKURCC22 ke media fermentasinya sebagai kandidat antibiotik.

BAHAN DAN METODE

Isolat Mikroorganisme

Trichoderma sp. LBKURCC22 yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat jamur dari tanah gambut Hutan Sekunder GSKBB yang terletak di Provinsi Riau. Isolat jamur ini diperoleh dari Laboratorium Riset Enzim, Fermentasi, dan Biomolekuler Universitas Riau. Bakteri dan jamur patogen dalam penelitian ini adalah *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yang juga merupakan koleksi dari Laboratorium Riset Enzim, Fermentasi dan Biomolekuler Universitas Riau.

Produksi dan Ekstraksi Metabolit Sekunder

Trichoderma sp. LBKURCC22 yang telah diremajakan dalam media *Potato Dextrose Agar* (PDA), dilakukan penentuan jumlah spora yang akan diinokulasi ke 50 mL media *Potato Dextrose Broth* (PDB) berdasarkan Sawitri (2012), konsentrasi yang diperoleh yaitu $32,61 \times 10^{12}$ spora/mL. Inokulum diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari pada *rotary*

shaker dengan kecepatan 150 rpm. Setelah 7 hari, inokulum dipindahkan ke dalam 100 mL media produksi antibiotik yang mengandung komposisi berikut (pH 5,6-5,8): glukosa 2%, ekstrak ragi 0,5%, pepton 0,5 %, MgSO_4 0,05%, KH_2PO_4 0,1%. Inkubasi dilanjutkan dengan *rotary shaker* pada 150 rpm pada suhu ruang selama 14 hari. Setelah 14 hari fermentasi, miselia dan media produksi dipisahkan dengan cara disaring pada kertas saring GF/C dengan corong Buchner. Setiap 1 Liter media produksi antibiotik diekstraksi dua kali dengan 500 mL etil asetat. Ekstrak etil asetat yang telah dikumpulkan, diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C. Sebelum diuapkan ekstrak etil asetat diberi penambahan Na_2SO_4 anhidrat. Ekstrak ini dapat disimpan pada suhu -20°C sebelum dipergunakan. Ekstrak pekat yang diperoleh dilarutkan dalam metanol.

Uji Fitokimia

Uji fitokimia dilakukan pada ekstrak untuk melihat kandungan metabolit sekunder selain peptaibol. Uji fitokimia yang dilakukan antara lain uji terpenoid/steroid, uji alkaloid, uji flavonoid, uji fenolik, dan uji saponin.

Uji Aktivitas Antibiotik Menggunakan Metode Difusi Cakram

Untuk mengetahui aktivitas antibiotik ekstrak terhadap *E. coli* dan *S. aureus* digunakan metode difusi cakram dengan 10 μL pada kertas cakram 6 mm dan didiamkan 1-2 menit hingga pelarutnya menguap. Pada uji ini yang bertindak sebagai kontrol positifnya adalah 10 μL Amoxsan® dengan konsentrasi 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dan kontrol negatif adalah 10 μL metanol. Kertas cakram yang pelarutnya telah menguap diletakkan pada cawan petri yang sudah diinokulasi bakteri dan jamur uji. Cawan kemudian diinkubasi selama 1 hari dalam inkubator dengan membalikkan cawan petri pada uji antibakteri dan 3 hari pada uji antijamur. Diameter zona bening diukur setelah diinkubasi dengan menggunakan jangka sorong.

Kromatografi Lapis Tipis dan Analisis HPLC

Ekstrak dianalisis dengan kromatografi lapis tipis (KLT) pada plat KLT SiO_2 menggunakan pelarut etil asetat : *n*-heksana 6:4 (v/v) sebagai eluen. Ekstrak diambil sebanyak $\pm 2 \mu\text{L}$ kemudian ditotolkan $\pm 1 \text{ cm}$ dari bawah plat KLT dengan menggunakan pipa kapiler. Selanjutnya dibiarkan beberapa saat hingga pelarutnya menguap dan dimasukkan ke dalam bejana pengembang. Setelah eluen naik sampai batas garis atas, plat dikeluarkan dan dikeringkan. Noda dideteksi dengan penyemprotan 0,5% *p*-anisaldehid dalam larutan metanol/ H_2SO_4 /asam asetat = 90:5:5 (v/v/v) dan dipanaskan dalam oven dengan suhu 110°C selama 20 menit untuk mendeteksi peptaibol. Indikator memperlihatkan keberadaan peptaibol dari ekstrak tersebut apabila terbentuk noda berwarna

merah terang (Chuttrakul *et al.* 2008). KLT ini difoto dan nilai Rf dari noda ditentukan yaitu jarak migrasi noda dibagi jarak migrasi eluen. Pemaparan dengan sinar UV 366 nm dilakukan sebelum penyemprotan untuk mendeteksi noda-noda lain yang berfluoresensi. Kemudian dilakukan analisis menggunakan HPLC untuk identifikasi senyawa yang terdapat dalam ekstrak.

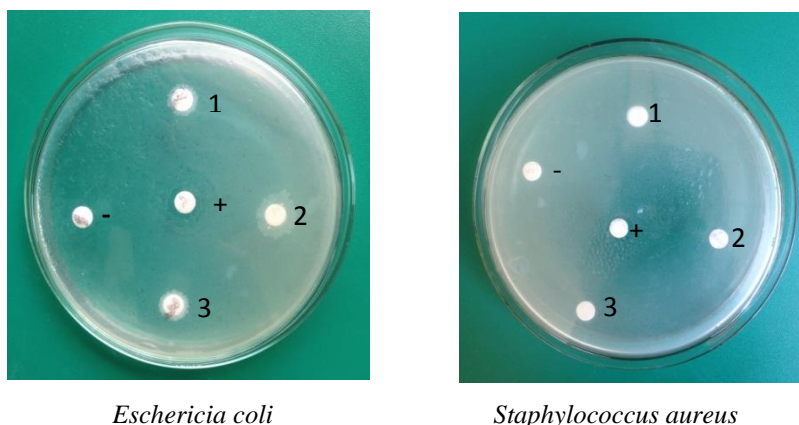
HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat *Trichoderma* sp. LBKURCC22 selama peremajaan mengalami perkembangan warna koloni yang berbeda dari hari ke-1 sampai hari ke-7. Perkembangan warna koloni diawali dengan warna putih, putih agak kehijauan, hingga hijau tua setelah umur 7 hari. Selama fermentasi berlangsung, media antibiotik yang awalnya berwarna kuning (hari ke-1) berubah menjadi kuning keruh dengan miselia jamur yang telah tumbuh (hari ke-14) pada media stimulasi dan tanpa stimulasi *E. coli*. Setelah fermentasi dilakukan, media produksi antibiotik dipisahkan dari miselinya dan dilakukan ekstraksi dengan etil asetat. Ekstrak yang diperoleh dievaporasi dan diperoleh ekstrak pekat. Uji fitokimia yang dilakukan terhadap

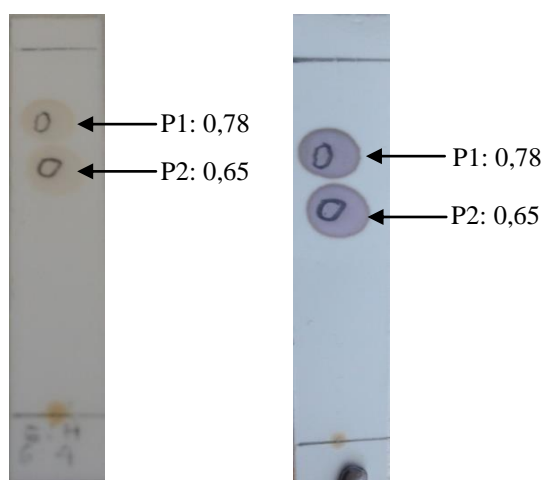
ekstrak menghasilkan uji yang positif terhadap uji alkaloid menghasilkan warna jingga dan putih terhadap pereaksi Mayer's dan Dragendorff's.

Untuk mengetahui aktivitas antibiotik ekstrak terhadap *E. coli* dan *S. aureus* dilakukan dengan variasi konsentrasi yaitu 1,9; 3,8; dan 5,7 mg/mL dengan menggunakan metode difusi cakram. Hasil uji aktivitas antibiotik ekstrak terhadap *E. coli* dan *S. aureus* menunjukkan bahwa ekstrak tidak memiliki aktivitas. Hal ini dapat dilihat pada Gambar 1.

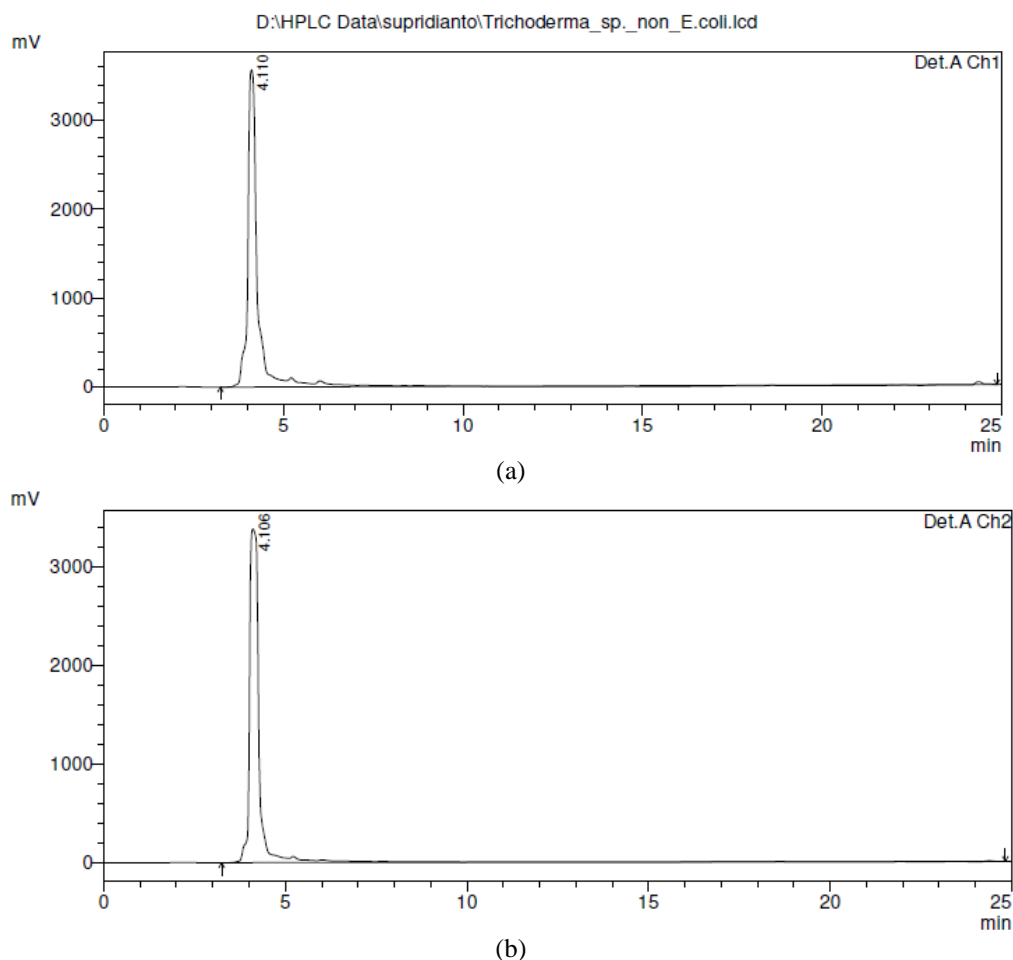
Ketidakmampuan ekstrak untuk menghambat diduga disebabkan oleh isolat jamur tidak menghasilkan metabolit yang berpotensi sebagai senyawa antibakteri dan metabolit yang dihasilkan jumlahnya sedikit. Menurut Pelczar (1988), bahwa semakin tinggi konsentrasi zat antimikroba maka semakin tinggi daya antimikrobanya, artinya banyak bakteri yang akan terbunuh lebih cepat apabila konsentrasi zat tersebut lebih tinggi (Azizah, 2008). Pada Gambar 1 terlihat bahwa *E. coli* dan *S. aureus* tumbuh di sekitar cakram, sehingga perlu dilakukan studi lanjut apakah ada potensi resistensi yang terbentuk untuk kedua bakteri tersebut.



Gambar 1. Uji ekstrak terhadap pertumbuhan antibakteri pathogen.



Gambar 2. Hasil KLT ekstrak sebelum penyemprotan 0,5% *p*-anisaldehyd dan diamati dibawah sinar UV 366 nm (a) dan setelah penyemprotan 0,5% *p*-anisaldehyd (b). Panah menunjukkan nilai Rf dari noda.



Gambar 3. Kromatogram Senyawa Metabolit Ekstrak pada 214 nm (a) dan pada 227 nm (b).

Analisis KLT dilakukan terhadap ekstrak karena terdapat hasil alkaloid pada hasil uji fitokimia. Hasil KLT ekstrak sebelum diberikan 0,5% *p*-anisaldehid terdapat dua noda berfluoresensi di bawah sinar UV 366 nm, yaitu P1 dan P2. Setelah penyempotan 0,5% *p*-anisaldehid, pada ekstrak tidak memberikan hasil yang positif untuk peptaibol dengan timbulnya noda (spot) merah tetapi memberikan hasil dengan timbulnya noda (spot) biru keabu-abuan (Gambar 2).

Hasil analisa HPLC ekstrak dapat dilihat pada Gambar 3. Dapat diamati pada kromatogram terdapat puncak yang tajam. Sehingga secara jelas dapat digambarkan bahwa senyawa ini memiliki kelarutan yang baik pada air dan cukup larut pada metanol dengan bantuan ultrasonik. Puncak yang tajam ini disebabkan oleh adanya daya ikat senyawa pada kolom sehingga dibutuhkan tekanan yang sedikit untuk mengeluarkan senyawa dari kolom. Pada hasil analisa KLT sebelumnya (Gambar 2) pada ekstrak memiliki 2 noda yang berfluoresensi pada 366 nm, ini memberikan indikasi bahwa terdapat senyawa lain yang berfluoresensi pada deteksi UV tetapi pada hasil uji HPLC tidak terdeteksi hanya terdapat satu puncak. Hal ini dapat terjadi karena panjang gelombang yang tidak sesuai untuk mendeteksi

senyawa tersebut. Diperlukan eksplorasi panjang gelombang lain dalam analisis HPLC.

KESIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan metabolit sekunder yang disekresikan jamur *Trichoderma* sp. LBKURCC20 tidak menunjukkan aktivitas antibiotika terhadap mikroba patogen yang diuji. Perlu eksplorasi lebih lanjut menggunakan mikroba patogen lain dan potensi aktivitas lain seperti produksi enzim hidrolitik. Kajian menarik lainnya adalah mengenai potensi resistensi pada bakteri *E. coli* dan *S. aureus*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai dari dana Program Kreativitas Mahasiswa (PKM) KEMRISTEKDIKTI 2017, dengan No kontrak 2341/UN19/KM/2017.

DAFTAR PUSTAKA

- Abubakar, H., Wahyudi, A.T. & Yuhana, M. (2011). Skrining bakteri yang berasosiasi dengan spons *Jaspis* sp. sebagai penghasil senyawa antimikroba. *Jurnal Ilmu Kelautan*. 16: 35–40.

- Azizah, N.N. (2008). *Isolasi dan indentifikasi jamur endofit dari daun jambu biji (Psidium guava L.) penghasil antibakteri terhadap bakteri Escherichia coli dan Staphylococcus aureus*. Skripsi. Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Malang. Malang.
- Chutrakul, C., Alcocer, M., Bailey, K. & Peberdy, J.F. (2008). The production and characterisation of trichotoxin peptaibols, by *Trichoderma asperellum*. *Chemistry & Biodiversity*. 5(9): 1694-1706.
- Rambiko, S.C., Fatimawali & Bodhi, W. (2016). Uji sensitivitas bakteri penyebab infeksi nosokomial saluran kemih akibat penggunaan kateter terhadap antibiotik ampicillin, amoxicillin dan ciprofloxacin di RSUP Prof. dr. R.D Kandou Manado. *PHARMACON*. 5(1): 1-7.
- Degenkolb, T., Von Doehren, H., Fog Nielsen, K., Samuels, G.J. & Brückner, H. (2008). Recent advances and future prospects in peptaibiotics, hydrophobin, and mycotoxin research, and their importance for chemotaxonomy of *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Chemistry & Biodiversity*. 5(5): 671-680.
- Duclohier, H. (2007). Peptaibiotics and peptaibols: an alternative to classical antibiotics?. *Chemistry & Biodiversity*. 4(6): 1023-1026.
- Gu, C. & Karthikeyan, K.G. (2008). Sorption of the antibiotic tetracycline to humic-mineral complexes. *Journal of Environmental Quality*. 37(2): 704-711.
- Hajnos, M.W., Sherma, J. & Kowalska, T. (2008). *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*. CRC Press. London.
- Matsumoto, K., Yamada, Y., Takahashi, M., Todoroki, T., Mizoguchi, K., Misaki, H., & Yuki, H. (1990). Fluorometric determination of carnitine in serum with immobilized carnitine dehydrogenase and diaphorase. *Journal Clinical Chemistry*. 36(12): 2072-2076.
- Mutawila, C., Vinale, F., Halleen, F., Lorito, M. & Mostert, L. (2016). Isolation, production and *in vitro* effects of the major secondary metabolite produced by *Trichoderma* species used for the control of grapevine trunk diseases. *Plant Pathology*. 65: 104-113.
- O'brien, J., Wilson, I. & Orton, T. (2000). Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*. 267(17): 5421-5426.
- Pelczar, M.J. & Chan, E.C.S. (1988). *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Edisi 2. Penerjemah: Hadioetomo, R.S., Imas, T., Tjitrosomo, S.S. & Angka, S.L. UI-Press. Jakarta.
- Phupiewkham, W., Sirithorn, P., Saksirirat, W. & Thammasirirak, S. (2015). Antibacterial agents from *Trichoderma harzianum* strain T9 against pathogenic bacteria. *Chiang Mai Journal of Science*. 42(2): 304-316.
- Sawitri, N. (2010). *Pemanfaatan beberapa parameter produksi kitinase Trichoderma asperellum T.N.C52 dan T.N.J63 pada berbagai substrat kitin*. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Riau. Pekanbaru.
- Sarker, S.D., Nahar, L. & Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*. 42(4): 321-324.
- Suhyana, J. (2012). *Isolasi Trichoderma sp. penghasil kitinase dari rhizosphere hutan gambut sekunder shelter sundak Giam Siak Kecil Bukit Batu (GSKBB), Riau*. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Riau. Pekanbaru.
- Suwondo, S., Sabiham, S., Sumardjo, S. & Paramudya, B., 2012. Efek pembukaan lahan terhadap karakteristik biofisik gambut pada perkebunan kelapa sawit di kabupaten Bengkalis. *Jurnal Natur Indonesia*. 14(2): 143-149.
- Vinale, F., Marra, R., Scala, F., Ghisalbert, E.L., Lorito, M., & Sivasithamparam, K. (2006). Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*. 43: 143-148.
- Webster, D., Timothy, D. G. L., & Moore, J. (2010). Antimycobacterial screening of traditional medicinal plants using the microplate resazurin assay. *Canadian Journal of Microbiology*. 56(12): 478-494.
- Wipf, P. & Kerekes, A.D. (2003). Structure reassignment of the fungal metabolite TAEMC161 as the phytotoxin viridiol. *Journal of Natural Products*. 66(5): 716-718.